

低温冷藏提高家蚕滞育卵 NAD 含量和胞质苹果酸脱氢酶活性

王启龙, 万华星, 姚金美, 司马杨虎, 赵林川*

(苏州大学基础医学与生物科学院, 江苏苏州 215123)

摘要: 为了调查 5℃ 低温处理是否改变家蚕 *Bombyx mori* 卵滞育 NAD 代谢, 本研究利用 HPLC 和分光光度法测定了经 25℃ 和 5℃ 分别处理的滞育卵中 NADH 含量、NAD⁺ 含量、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和胞质苹果酸脱氢酶 (cMDH) 活性。结果表明: 5℃ 处理的 NAD (NADH + NAD⁺) 含量和 cMDH 活性分别增加了 106% 和 53%, 并且显著高于 25℃ 处理 ($P < 0.01$); 但是两种处理的 NADH/NAD⁺ 比值和 LDH 活性没有显著差异 ($P > 0.05$)。据此推测, 5℃ 低温处理加强了家蚕滞育卵 NAD⁺ 合成和再生能力。

关键词: 家蚕; 滞育解除; 辅酶 NAD; 乳酸脱氢酶; 胞质苹果酸脱氢酶

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)09-1031-06

Chilling enhances the NAD levels and cytosolic malate dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*

WANG Qi-Long, WAN Hua-Xing, YAO Jin-Mei, SIMA Yang-Hu, ZHAO Lin-Chuan* (School of Biological and Basic Medicine Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: To investigate whether chilling at 5℃ changes the metabolism of NAD in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, the levels of NADH and NAD⁺ along with the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and cytosolic malate dehydrogenase (cMDH) in diapause eggs incubated at 25℃ and 5℃, respectively, were determined using HPLC and spectrophotometric methods. NAD (NADH + NAD⁺) levels and the cMDH activity in diapause eggs incubated at 5℃ increased by 106% and 53%, respectively, which were significantly higher than those in diapause eggs incubated at 25℃ ($P < 0.01$). However, no significant difference in the NADH/NAD⁺ ratio and the LDH activity was observed between the incubation treatments at 25℃ and 5℃ ($P > 0.05$). It is so inferred that the ability for NAD⁺ synthesis and regeneration in *Bombyx* diapause eggs is enhanced by chilling.

Key words: *Bombyx mori*; diapause termination; nicotinamide adenine dinucleotide; lactate dehydrogenase; cytosolic malate dehydrogenase

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 包括还原型 (NADH) 和氧化型 (NAD⁺) 两种类型。通过糖酵解和三羧酸循环, NAD⁺ 被还原为 NADH, NADH 经过呼吸电子传递链的传递, 最终被 O₂ 氧化为 NAD⁺, 同时生成 ATP 和 H₂O。可见, NAD (NADH + NAD⁺) 含量和 NADH/NAD⁺ 比值的变化与呼吸耗氧量关系密切。NAD⁺ 再生是上述过程能否持续不断地顺利进行的前提条件之一。除了通过呼吸电子传递链再生 NAD⁺ 途径外, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和胞质苹果酸脱氢酶 (cytosolic malate

dehydrogenase, cMDH) 也能够催化 NAD⁺ 再生。LDH 是糖酵解途径中的一个重要酶, 催化丙酮酸被 NADH 还原生成乳酸, 同时完成 NAD⁺ 的再生。cMDH 是苹果酸-天冬氨酸穿梭机制中的关键酶, 催化草酰乙酸被 NADH 还原为苹果酸, 同时完成 NAD⁺ 的再生 (Ying, 2008)。

家蚕 *Bombyx mori* 是典型的卵滞育昆虫。即时浸酸可以阻止家蚕滞育性卵的滞育发动, 低温冷藏能够解除其滞育状态 (Yamashita, 1996; 黄君霆, 2003)。此前我们的研究表明, 即时浸酸在提高呼吸耗氧量的同时, 显著提高了 NAD 含量, 但是未显

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272501)

作者简介: 王启龙, 男, 1989 年 7 月生, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事自由基生物学研究, E-mail: wqlong0605@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sdzlc2008@163.com

收稿日期 Received: 2012-08-15; 接受日期 Accepted: 2012-09-18

著改变 NADH/NAD⁺ 比值(姚金美等, 2012)。为了调查低温处理在解除家蚕卵滞育的同时是否也显著改变其 NAD 代谢, 我们从家蚕滞育性卵产下后 48 h 开始分别进行 25℃ 和 5℃ 处理, 并且利用 HPLC 和分光光度法测定了 NADH 含量、NAD⁺ 含量、LDH 活性和 cMDH 活性的变化。结果发现低温处理显著提高了 NAD 含量和 cMDH 活性。

1 材料与方法

1.1 家蚕品种

二化性、单系家蚕原种大造(Dazao), 由苏州大学蚕桑研究所提供。

1.2 家蚕滞育性卵的获得及处理

家蚕卵在温度 25℃、自然光照下催青, 孵化后用常规桑叶饲养, 幼虫期、蛹期和成虫期都置于 25℃、光周期 12L: 12D 中, 以生产滞育性家蚕卵(Morita *et al.*, 2003)。滞育性家蚕卵保存于 25℃ 中, 在产下后 48 h 取出部分蚕卵, 经过 15℃、2 h 过渡后, 转入 5℃ 中进行低温处理, 以解除滞育状态, 共处理 90 d。分别在低温处理后 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 和 90 d 取蚕卵样品 5 g, 样品在液氮中速冻后置于 -70℃ 保存, 分别用于 NADH 含量、NAD⁺ 含量、LDH 活性和 cMDH 活性测定。所有测定重复 3 次。

1.3 家蚕卵 NADH 和 NAD⁺ 含量测定

25℃ 和 5℃ 处理的家蚕卵中 NADH 和 NAD⁺ 提取和含量测定采用 NAD 含量测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司), 测定方法按照试剂盒说明进行。HPLC 分析条件同姚金美等(2012), 使用的高效液相色谱仪和色谱柱的型号分别为 Waters 1525 和 Agilent ZORBAX Sb-aq (250 mm × 4.6 mm)。

1.4 家蚕卵 LDH 和 cMDH 活性测定

25℃ 和 5℃ 处理的家蚕卵中 LDH 和 cMDH 提取和活性测定分别采用 LDH 活性测定试剂盒和 cMDH 活性测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司), 测定方法按照试剂盒说明进行。在 37℃ 下测定 LDH 活性, 活性单位为 nmol/mg pro · min。在 25℃ 下测定 cMDH 活性, 活性单位定义为 nmol/mg pro · min。

1.5 数据统计与分析

采用 ANOVA 和 Student's Newman-Keuls post hoc test (SPSS Inc., USA) 比较 25℃ 和 5℃ 处理家蚕

滞育卵中 NADH, NAD⁺ 和 NAD 含量以及 NADH/NAD⁺ 比值、LDH 活性和 cMDH 活性的差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 两种温度处理对家蚕滞育卵 NADH 含量的影响

处理期间, 25℃ 处理的家蚕滞育卵 NADH 含量无显著变化, 5℃ 处理的 NADH 含量增加了 117%; 后者 NADH 含量在处理后的 10–30 d 期间显著高于前者($P < 0.05$), 处理后 40–90 d 期间极显著高于前者($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 226% (图 1)。

2.2 两种温度处理对家蚕滞育卵 NAD⁺ 含量的影响

处理后 0–10 d, 25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵 NAD⁺ 含量分别下降了 30% 和 25%; 处理后 10–90 d, 25℃ 处理的 NAD⁺ 含量无显著变化, 5℃ 处理的 NAD⁺ 含量升高了 73%; 后者 NAD⁺ 含量在处理后的 10–30 d 期间显著高于前者($P < 0.05$), 处理后 40–90 d 期间极显著高于前者($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 200% (图 2)。

2.3 两种温度处理对家蚕滞育卵 NAD 含量的影响

处理期间, 25℃ 处理的家蚕滞育卵 NAD 含量下降了 8%, 5℃ 处理的 NAD 含量增加了 106%; 后者 NAD 含量在处理后的 10–30 d 期间显著高于前者($P < 0.05$), 处理后 40–90 d 期间极显著高于前者($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 224% (图 3)。

2.4 两种温度处理对家蚕滞育卵 NADH/NAD⁺ 比值的影响

处理后 0–10 d, 25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵 NADH/NAD⁺ 比值分别升高了 43% 和 60%; 处理后 10–90 d, 两者 NADH/NAD⁺ 比值处于波动中, 后者高于前者, 但是差异不显著(图 4)。

2.5 两种温度处理对家蚕滞育卵 LDH 活性的影响

处理后 0–10 d, 25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵 LDH 活性分别下降了 51% 和 47%; 处理后 10–90 d, 两者 LDH 活性都略有升高, 但是不存在显著差异(图 5)。

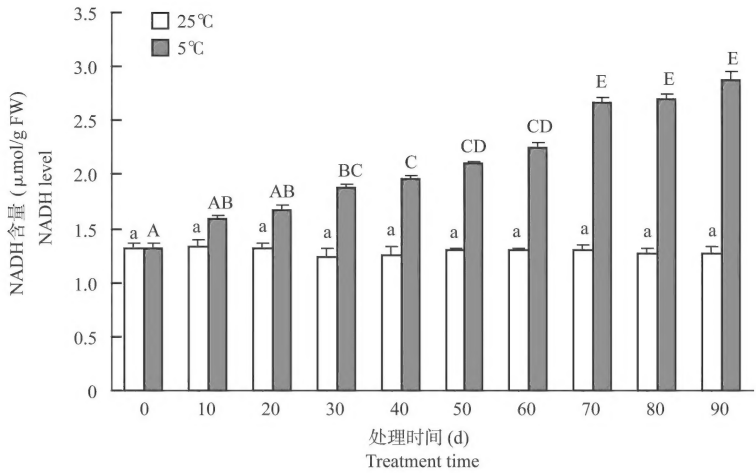


图 1 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NADH 含量的变化

Fig. 1 Changes in NADH level in the 25°C - and 5°C -treated diapause eggs of *Bombyx mori*

柱上不同大、小写字母分别表示 5℃和 25℃下不同处理时间在 0.05 水平上存在显著差异 (*t* 检验); 下图同。Different capital and small letters above bars indicate significant difference among different treatment time at 5°C and 25°C, respectively (*t* test). The same for the following figures.

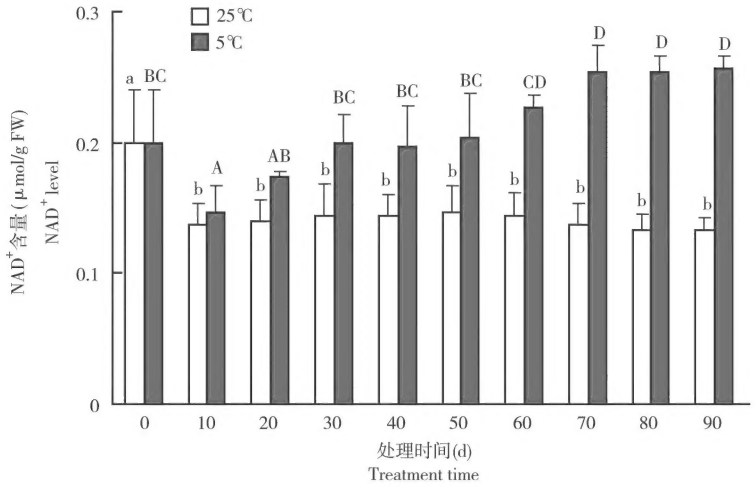


图 2 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NAD⁺ 含量的变化

Fig. 2 Changes in NAD⁺ level in the 25°C - and 5°C -treated diapause eggs of *Bombyx mori*

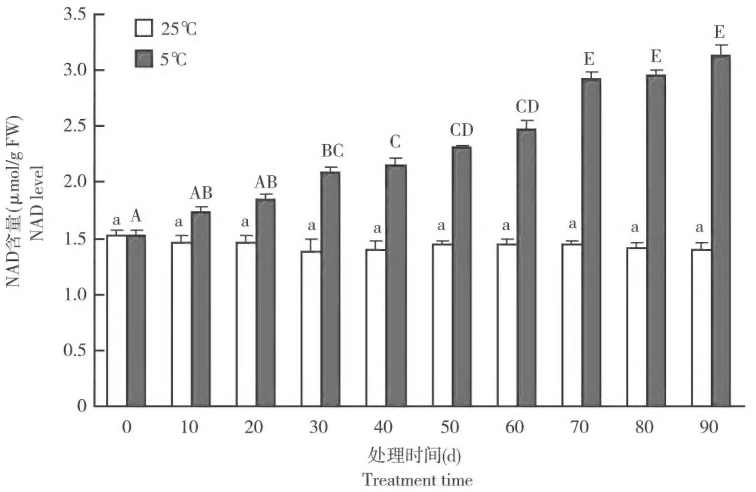


图 3 25℃和 5℃处理家蚕滞育卵中 NAD 含量的变化

Fig. 3 Changes in NAD level in the 25°C - and 5°C -treated diapause eggs of *Bombyx mori*

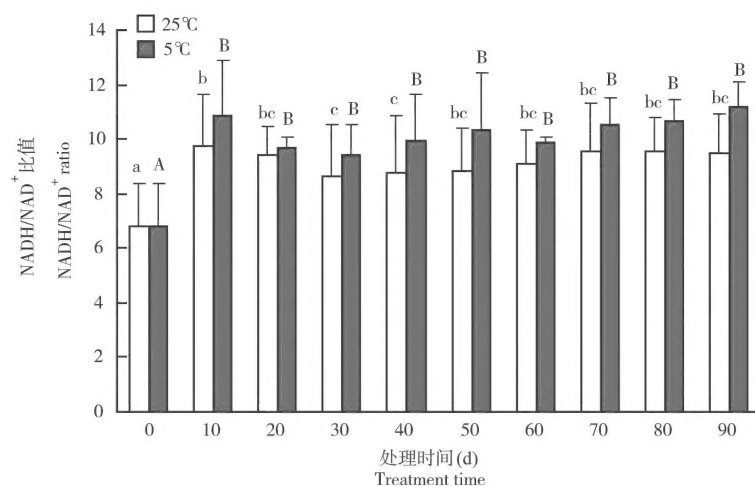
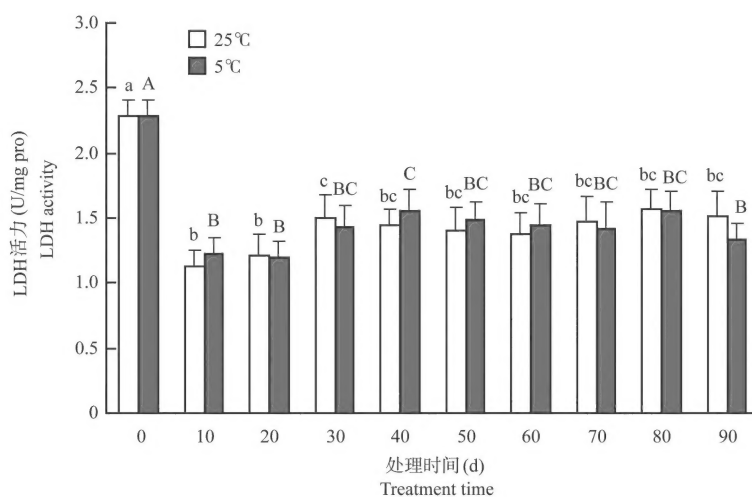
图4 25℃和5℃处理家蚕滞育卵中 NADH/NAD⁺ 比值的变化Fig. 4 Changes in NADH/NAD⁺ ratio in the 25°C- and 5°C-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

图5 25℃和5℃处理家蚕滞育卵中 LDH 活性的变化

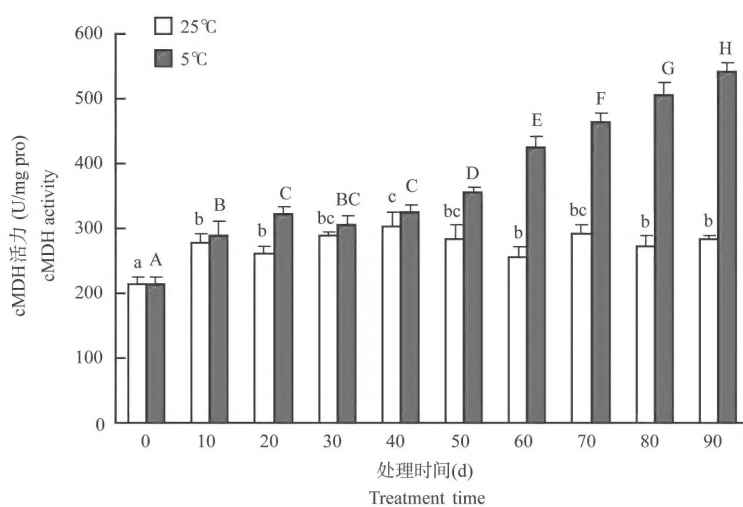
Fig. 5 Changes in LDH activity in the 25°C- and 5°C-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

图6 25℃和5℃处理家蚕滞育卵中 cMDH 活性的变化

Fig. 6 Changes in cMDH activity in the 25°C- and 5°C-treated diapause eggs of *Bombyx mori*

2.6 两种温度处理对家蚕滞育卵 cMDH 活性的影响

处理期间, 25℃ 处理的家蚕滞育卵 cMDH 活性在 40 d 形成峰值, 5℃ 处理的 cMDH 活性升高了 53%; 后者 cMDH 活性在处理 10–40 d 期间与前者不存在显著差异, 处理 50 d 时显著高于前者 ($P < 0.05$), 处理后 60–90 d 期间极显著高于前者 ($P < 0.01$), 处理 90 d 时后者相当于前者的 192% (图 6)。

3 讨论

本研究结果表明, 25℃ 处理在维持滞育状态的同时, 家蚕滞育卵的 NAD 含量略有下降; 相反, 5℃ 处理在解除滞育状态的同时, 极显著地提高了 NAD 含量。NAD 含量主要受到 NAD^+ 合成和降解平衡的影响 (Ying, 2008)。可见, 与即时浸酸一样, 5℃ 处理的家蚕滞育卵中 NAD^+ 合成大于 NAD^+ 降解。此外, NAD 激酶催化 NAD^+ 磷酸化生成氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP^+), NADP^+ 磷酸酶催化相反的反应 (Kawai and Murata, 2008)。因此, NAD 含量还受到 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 相互转化状况的影响。5℃ 处理还显著提高了家蚕滞育卵的 $\text{NADP}(\text{NADPH} + \text{NADP}^+)$ 含量和 NAD 激酶活性 (另文发表)。据此可以进一步推测, 5℃ 处理通过加强 NAD^+ 合成来提高家蚕滞育卵 NAD 含量。

25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵呼吸耗氧量不存在显著差异 (Yaginuma and Yamashita, 1999)。可见, 5℃ 处理未显著改变家蚕滞育卵中通过呼吸电子传递链氧化再生 NAD^+ 的能力。25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵 LDH 活性不存在显著差异, 但是 5℃ 处理的 cMDH 活性从处理 50 d 开始显著高于 25℃ 处理。该结果表明, 5℃ 处理 50 d 以上能够通过提高 cMDH 活性来加强家蚕滞育卵中 NAD^+ 再生能力。

与 NAD 含量不同, NADH/NAD^+ 比值主要受到 NADH 氧化和 NAD^+ 还原平衡状况的影响 (Ying, 2008)。本研究表明, 25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵 NADH/NAD^+ 比值不存在显著差异。NAD-山梨醇脱氢酶 (NAD dependent sorbitol dehydrogenase, NAD-SDH) 催化山梨醇转化为糖原时, NAD^+ 被还原生成 NADH。在产下后 2 d 对家蚕滞育卵进行

5℃ 处理, 山梨醇脱氢酶 (sorbitol dehydrogenase, SDH) 活性大约从处理 40 d 开始显著升高 (Niimi *et al.*, 1993)。这意味着 5℃ 处理的家蚕滞育卵中 NAD^+ 从处理 40 d 开始被还原为 NADH。如上所述, 5℃ 处理的 cMDH 活性从处理 50 d 开始显著高于 25℃ 处理。可见, 5℃ 处理通过同时提高 SDH 和 cMDH 活性来达成 NADH 氧化和 NAD^+ 还原平衡, 从而导致 25℃ 和 5℃ 处理的家蚕滞育卵 NADH/NAD^+ 比值不存在显著差异。

在 5℃ 中, 家蚕滞育卵的呼吸耗氧量一直保持在极低水平。如果在冷藏不同时间后转入 25℃ 中, 其呼吸耗氧量的变化表现出两种情况: (1) 冷藏时间少于 50 d, 呼吸耗氧量升高程度有限; (2) 冷藏时间超过 60 d, 呼吸耗氧量显著升高 (Yaginuma and Yamashita, 1999)。本研究结果表明, 在 5℃ 处理过程中家蚕滞育卵 NAD^+ 合成能力持续增强, NAD^+ 再生能力直到处理 50 d 以后才开始显著增强。据此可以推测, 5℃ 处理 50 d 以内, 虽然 NAD^+ 合成能力显著增加, 但是 NAD^+ 再生能力较低, 不足以维持高强度的糖酵解-三羧酸循环, 因此家蚕滞育卵呼吸耗氧量在 5℃ 和 25℃ 中都较低; 5℃ 处理 50 d 以上, NAD^+ 合成能力进一步增加, 同时 NAD^+ 再生能力开始显著增强, 能够维持高强度的糖酵解-三羧酸循环, 5℃ 低温抑制了呼吸作用, 导致呼吸耗氧量仍然维持于极低水平, 但是 NAD^+ 合成和再生能力增强为转入 25℃ 后呼吸耗氧量迅速升高奠定了基础。

近年来, 低温处理解除家蚕滞育分子机制的研究取得了很大进展 (Moribe *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2009; 侯宜胜等, 2010; 孟刚等, 2010; Sima *et al.*, 2011; 王丽等, 2011; 姚金美等, 2012), 但是关于低温处理对家蚕滞育卵 NAD 代谢的研究还未见报道。本研究结果表明, 5℃ 处理显著增强了家蚕滞育卵 NAD^+ 合成和再生能力。鉴于 NAD 是能量代谢、线粒体功能、钙稳态、氧化胁迫和基因表达等不同生物学过程的重要调控因子, 而且在家蚕滞育发动、即时浸酸阻止滞育发动和低温处理解除滞育过程中 NAD^+ 合成和再生能力都发生了显著变化 (Ying, 2008; 姚金美等, 2012), 今后有必要进一步对家蚕滞育卵 NAD 代谢及其功能做深入研究。

参考文献 (References)

- Hou YS, Wang L, Yao JM, Zhao LC, 2010. Variations of hydrogen peroxide and catalase gene expression in *Bombyx mori* diapause eggs

- and HCl-treated eggs during cold storage. *Acta Sericol. Sin.*, 36(4): 697–701. [侯宜胜, 王丽, 姚金美, 赵林川, 2010. 冷藏期间家蚕滞育卵和即时浸酸卵的 H_2O_2 含量及过氧化氢酶基因表达的变化. 蚕业科学, 36(4): 697–701]
- Huang JT, 2003. Studies on the molecular mechanism of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sin.*, 29: 1–6. [黄君霆, 2003. 家蚕滞育分子机制的研究. 蚕业科学, 29: 1–6]
- Kawai S, Murata K, 2008. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD(H) and NADP(H). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(4): 919–930.
- Lin JL, Lin PL, Gu SH, 2009. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in relation to diapause processing in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 55(6): 593–598.
- Meng G, Sima YH, Zhao LC, 2010. Variation of glutathione S-transferase in eggs of bivoltine strain (*Bombyx mori*) during diapause process. *Acta Sericol. Sin.*, 36(1): 170–174. [孟刚, 司马杨虎, 赵林川, 2010. 二化性家蚕滞育过程中谷胱甘肽 S-转移酶活性的变化. 蚕业科学, 36(1): 170–174]
- Moribe Y, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2001. Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domain (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs. *Eur. J. Biochem.*, 268(12): 3432–3442.
- Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 1993. A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 213: 1125–1131.
- Sima YH, Yao JM, Hou YS, Wang L, Zhao LC, 2011. Variations of hydrogen peroxide and catalase gene expression in *Bombyx* eggs during diapause initiation and termination. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 77(2): 72–80.
- Wang L, Hou YS, Yao JM, Sima YH, Zhao LC, 2011. Effect of low temperature on the ratio of GSH and GSSG in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sin.*, 37(1): 52–56. [王丽, 侯宜胜, 姚金美, 司马杨虎, 赵林川, 2011. 低温处理对家蚕滞育卵还原型与氧化型谷胱甘肽比值的影响. 蚕业科学, 37(1): 52–56]
- Yaginuma T, Yamashita O, 1999. Oxygen consumption in relation to sorbitol utilization at the termination of diapause in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 45: 621–627.
- Yamashita O, 1996. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.*, 42: 669–679.
- Yao JM, Wan HX, Sima YH, Zhao LC, 2012. Instant hydrochloric acid soaking enhances NAD(H) and NADP(H) levels in diapausing eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 55(1): 24–28. [姚金美, 万华星, 司马杨虎, 赵林川, 2012. 即时浸酸显著提高滞育性家蚕卵辅酶 I 和 II 含量. 昆虫学报, 55(1): 24–28]
- Ying WH, 2008. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.*, 10(2): 179–206.

(责任编辑: 赵利辉)